

# Иммуногистохимический анализ молекулярно-клеточных структур врожденного и адаптивного иммунитета у больных псориазом в процессе биологической терапии

О.Р. Катунина

Immunohistochemical analysis of molecular cell structures of genetic and adaptive immunity in patients suffering from psoriasis in the course of biological therapy

O.R. KATUNINA

об авторе:

О.Р. Катунина — к.м.н., доцент, заведующий лабораторией патоморфологии ФГБУ «ГНЦДК» Министерства здравоохранения и социального развития России, Москва

В настоящей работе иммуногистохимическим методом изучено влияние биологического модификатора иммунных реакций инфликсимаба на иммунопатогенетические механизмы непосредственно в пораженной коже больных псориазом.

Ключевые слова: **псориаз, инфликсимаб, толл-подобные рецепторы, TLR2, TLR4, клетки Лангерганса, CD1a, молекулы адгезии, клеточный инфильтрат, иммуногистохимическое исследование.**

The author used the immunohistochemical method to study an effect of the biological modifier of immune reactions of Infliximab on immunopathogenetic mechanisms directly in the affected skin of patients suffering from psoriasis.

Key words: **psoriasis, Infliximab, Toll-like receptors, TLR2, TLR4, Langerhans cells, CD1a, adhesion molecules, cellular infiltrate, immunohistochemistry study.**

■ Псориаз является мультифакториальным заболеванием кожи, поражающим от 1 до 3% мировой популяции [1, 2]. Отечественные и зарубежные исследователи определяют следующие основные отличительные особенности псориаза: это хроническое рецидивирующее заболевание, характеризующееся появлением ярко-розовых и красных папул, сливающихся в бляшки, покрытые серебристо-белыми чешуйками, в основе формирования которых лежит нарушение пролиферации и дифференцировки кератиноцитов, сочетающееся с усилением процессов ангиогенеза, инфильтрацией эпидермиса и дермы мононуклеарными клетками [3—6]. Перечисленные феномены опосредуются и поддерживаются провоспалительными цитокинами.

Несмотря на многочисленные исследования, патогенез псориаза и механизмы его возникновения до конца непонятны. В связи с чем терапия псориаза является сложной задачей современной дерматологии. В качестве основных современных средств системной

терапии используют метотрексат, циклоспорин, ретиноиды, фототерапию и фотохимиотерапию, которые являются достаточно эффективными, но в то же время могут вызывать ряд нежелательных явлений (гепато- и нефротоксичность, миелосупрессия, тератогенность, и др.). Существующие классические методы системной терапии псориаза не приводят к полному излечению и направлены лишь на снижение степени тяжести заболевания, увеличение периодов ремиссии.

В последние годы в терапии больных псориазом применяются препараты, модулирующие иммунные реакции в коже. Обоснованием для их применения явились данные об особенностях взаимодействия клеток кожи и иммунной системы. Известно, что при возникновении воспалительного процесса кожа становится частью иммунной системы без центрального аналитического звена. В частности, при псориазе активированные антигенпредставляющие клетки мигрируют в регионарные лимфатические узлы, где происходит запуск каскада реакций с последующей активацией и проли-

ферацией клеток иммунной системы — лимфоцитов. До начала активации антигенпредставляющих клеток и лимфоцитов на внедрение патогена реагируют кератиноциты, тканевые базофилы, макрофаги, эндотелиоциты сосудов, в результате чего продуцируются разнообразные медиаторы, в том числе провоспалительный цитокин фактор некроза опухоли — альфа (ФНО- $\alpha$ ). Были получены данные, что ингибирование действия ФНО- $\alpha$  прерывает развитие воспаления в коже, что послужило основанием для применения антител, связывающих этот цитокин в терапии больных псориазом. В России для лечения псориаза и псориатического артрита используется препарат инфликсимаб (Ремикейд), связывающий как трансмембранную, так и растворимую формы ФНО- $\alpha$  и предотвращающий развитие его биологических эффектов.

Отечественные и зарубежные исследователи приводят данные, свидетельствующие о более высокой эффективности инфликсимаба по сравнению с обычными системными методами лечения [7—10]. Однако сведения о структурных изменениях, развивающихся в коже больных на фоне терапии инфликсимабом, отражены в литературе недостаточно.

Целью нашего исследования явилось изучение особенностей функционирования врожденного и адаптивного иммунитета в коже больных псориазом на фоне терапии биологическим модификатором иммунных реакций инфликсимабом.

## Материал и методы

Исследуемую группу составили 38 больных (25 мужчин и 13 женщин в возрасте от 19 до 70 лет), у которых наблюдался псориаз среднетяжелой и тяжелой степени (индекс PASI >10) с короткими периодами ремиссии, отмечались неудовлетворительные результаты лечения при назначении ретиноидов, метотрексата, циклоспорина, фотохимиотерапии. В соответствии с Основами законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан до начала проведения диагностических манипуляций и лечения все пациенты знакомились и подписывали информированное добровольное согласие на медицинское вмешательство. До начала лечения больных тщательно обследовали для исключения новообразований, туберкулеза, тяжелых хронических инфекций, сердечно-сосудистой недостаточности. Женщины детородного возраста включались в исследование после получения отрицательного теста на беременность, при условии использования высокоэффективных методов контрацепции.

Инфликсимаб вводили в дозе 5 мг/кг массы тела внутривенно капельно. Повторные введения препарата осуществляли через 2 и 6 нед. после первого введения и далее каждые 8 нед. Непосредственно перед каждым введением препарата всем больным проводили исследование общих анализов крови и мочи,

биохимического анализа крови (исследование уровня трансаминаз, общего и связанного билирубина, продуктов азотистого обмена). До и во время проведения инфузии каждые 30 мин. больным измеряли частоту сердечных сокращений, частоту дыхательных движений, артериальное давление. По окончании проведения инфузии эти показатели измеряли каждые 30 мин. в течение двух часов, затем больной оставался под наблюдением дежурного врача.

У 15 больных исследуемой группы (6 женщин и 9 мужчин) в возрасте от 19 до 59 лет проводились иммуногистохимические исследования. Забор биоптатов кожи проводился под местной анестезией 2% раствором лидокаина. До начала лечения биоптаты брали из центра очагов поражения, повторно биопсийный материал забирали на 6-й неделе лечения из участков, расположенных в непосредственной близости с местом первой биопсии. У 6 из 15 больных исследуемой группы забор 3-й биопсии проводился через 1 год от начала терапии. В этом случае забор биопсийного материала проводился из имеющихся на момент осмотра очагов поражения.

Фиксацию биопсийного материала осуществляли в 10% растворе забуференного формалина. После отмывания фиксатора в проточной воде проводилась стандартная гистологическая проводка биоптатов в автоматизированной вакуумной системе обработки тканей Leica ASP300 (Германия) путем обезживания в этиловом спирте. Затем кусочки ткани пропитывали парафином, заливали в парафиновые блоки, из которых на ротационном микротоме Leica RM2125RT (Германия) изготавливали срезы толщиной 5 мкм, растягивали их на предметных стеклах с полилизинным покрытием Vision biosystems plus slides (Великобритания).

Изучение количества и распределения в структурах кожи основных субпопуляций Т-клеток — CD4+ (Т хелперы/индукторы), CD8+ (цитотоксические Т-лимфоциты) и CD45RO+ (Т-клетки памяти), антигенпрезентирующих клеток (клеток Лангерганса) — CD1a+, толл-подобных рецепторов 2, 4 и 9 классов (TLR2, TLR4 и TLR9), молекул межклеточной адгезии ICAM-1 и Е-селектина, провоспалительных цитокинов ИЛ-1 и ФНО- $\alpha$  проводили непрямым иммунопероксидазным иммуногистохимическим методом. Для иммунофенотипирования использовали мышиные моноклональные антитела против CD4 (клон 1F6), CD8 (клон 1A5), CD45RO (клон UCHL1), CD1a (клон МТВ1), CD54 (клон 23G12) и CD62-E (клон 16G4) человека производства фирмы Vision biosystems novocastra (Великобритания), кроличьи поликлональные антитела против TLR2 (регистрационный № О60603), TLR4 (регистрационный № О00206), TLR9 (регистрационный № ab53396), ИЛ-1 (регистрационный № P01583) и ФНО- $\alpha$  (регистрационный № P01375) человека производства фирмы Abbiotec (США), а также перокси-

дазную детекционную систему Novocastra Peroxidase Detection System производства «Leica Microsystems» (Великобритания), включающую вторичные универсальные биотинилированные антитела и стрептавидин-пероксидазный комплекс. Визуализация реакции осуществлялась DAB-хромогеном. Постановку иммуногистохимической реакции осуществляли согласно протоколам, прилагаемым к используемым антителам. Высокотемпературная антигенная демаскировка проводилась путем кипячения в цитратном буфере (pH — 6,0) в СВЧ-печи при максимальной мощности 900 Вт тремя циклами по 5 мин. с 1-минутными перерывами. Остывшие препараты промывали в растворе ТРИС-буфера (pH 7,54—7,58), обрабатывали 0,3% раствором перекиси водорода на метаноле (1:1) для предотвращения эндогенной пероксидазной активности. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 60 мин. при комнатной температуре (23 °C), со вторичными — в течение 30 мин. в термостате при температуре 37 °C. Для завершения окрашивания осуществляли фоновое контрастирование срезов гематоксилином Майера. Полученные гистологические и иммуногистохимические препараты заключали под покровное стекло и изучали с помощью светового микроскопа Leica DM4000B (Германия).

Морфометрический анализ проводили с применением компьютерной программы анализа изображения ImageJ. Для этого в каждом срезе цифровой фотокамерой с высоким разрешением Leica DFC320 (Германия) фотографировали по 5 полей зрения в эпидермисе на отрезке длиной 0,5 мм, в дерме площадью 0,15 мм<sup>2</sup>, в которых проводили подсчет клеток с положительной реакцией, затем рассчитывали среднее значение показателя. Экспрессию толл-подобных рецепторов, молекул адгезии, провоспалительных цитокинов определяли измерением площади эпидермиса и сосудов дермы с положительной реакцией клеток в квадратных пикселях (pix<sup>2</sup>). Содержание толл-подобных рецепторов, молекул адгезии, провоспалительных цитокинов на стенках сосудов выражали в процентах по отношению к общей площади поля зрения.

Статистический анализ проводили с применением пакета прикладных программ STATISTICA 8. Проверка на нормальность распределения осуществлялась с помощью критерия Шапиро — Уилкса. Описательная статистика количественных признаков представлена в виде медиан, в скобках приведены границы интерквартильных отрезков (в формате Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>]). При сравнении показателей до и после лечения внутри группы (анализ признаков в динамике) использовали Wilcoxon test. Оценка корреляционных связей осуществлялась с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при значении уровня достоверности ниже 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## Результаты

Продолжительность заболевания у больных варьировала от 2 до 42 лет (в среднем 18 лет), у 17 пациентов исследуемой группы (45%) был отягощен наследственный анамнез по псориазу. У 24 больных (63%) наблюдался вульгарный псориаз, у 14 (37%) — эритродермическая форма псориаза. Величина индекса PASI колебалась от 10 до 65,4 балла (средняя величина 35,6 балла). У 28 больных (74%) помимо кожного процесса наблюдался псориатический полиартрит с вовлечением в процесс лучезапястных, локтевых, коленных, голеностопных, плюсневых, плюснефаланговых и межфаланговых суставов.

Переносимость лечения инфликсимабом была хорошей. Во время терапии не было выявлено случаев развития туберкулеза, сердечно-сосудистой недостаточности, аутоиммунных и инфекционных заболеваний. Среднее значение индекса PASI к 6-й неделе лечения снизилось с 35,6 до 5,4 балла, что свидетельствует о выраженном уменьшении активности заболевания под действием проводимого лечения. На 6-й неделе лечения (после 3-й инфузии) биологическим препаратом инфликсимаб клиническое выздоровление наблюдалось у 12 (32%) больных, значительное улучшение у 19 (50%) больных, улучшение у 5 (13%) больных. У 1 больного лечение оказалось неэффективным. Состояние этого больного оставалось тяжелым, сохранялась эритродермия, наблюдались выраженная инфильтрация и шелушение кожного покрова. Индекс PASI не претерпевал значительных изменений (до лечения 51 балл, на 6-й неделе лечения 48 баллов). Во время наблюдения за больными в течение 1—1,5 лет у части больных за 1—2 недели до ожидаемой инфузии инфликсимаба появлялись немногочисленные папулезные элементы бледно-розовой окраски, с незначительной инфильтрацией и шелушением. Высыпания были локализованы преимущественно на коже конечностей, местами сливались в бляшки до 2 см в диаметре.

На 6-й неделе лечения препаратом инфликсимаб в коже больных отмечалось статистически значимое снижение экспрессии толл-подобных рецепторов 2 и 4. Площадь экспрессии TLR2 в эпидермисе снижалась до 944954 pix<sup>2</sup> [695425 ÷ 1748427] ( $p < 0,004$ ), в дерме до 2,9% [2,5 ÷ 5,1]. Площадь экспрессии TLR4 уменьшалась в эпидермисе до 1006812 pix<sup>2</sup> [729862 ÷ 161778], в дерме до 5,8% [2,4 ÷ 6,4]. Количество CD1a+ клеток достоверно уменьшалось в дерме, в эпидермисе наблюдалась тенденция к уменьшению их количества (табл. 1). При анализе биоптатов кожи больных, полученных через 1 год от начала терапии, абсолютные показатели содержания толл-подобных рецепторов в эпидермисе и дерме были ниже, чем до начала лечения (табл. 2). Содержание CD1a+ клеток Лангерганса в эпидермисе через 1 год оставалось достаточно высоким. При сравнении исследуемых по-

ТАБЛИЦА 1

**Содержание толл-подобных рецепторов и клеток Лангерганса в пораженной коже больных псориазом до начала лечения и на 6-й неделе терапии инфликсимабом**

Показатель	До лечения ( $n = 15$ )	6-я неделя лечения ( $n = 15$ )	$p$
TLR2 Э (pix <sup>2</sup> )	2104937 [1499199 ÷ 2207776]*	944954 [695426 ÷ 1748427]	0,004
TLR2 Д (%)	5,4 [4,8 ÷ 9,0]	2,9 [2,5 ÷ 5,1]	0,004
TLR4 Э (pix <sup>2</sup> )	2075337 [1459871 ÷ 2277101]	1006812 [729862 ÷ 1611778]	0,005
TLR4 Д (%)	8,1 [4,9 ÷ 9,4]	5,8 [2,4 ÷ 6,4]	0,006
CD1a+ Э (абс. к-во / 0,5 мм)	29,6 [19,4 ÷ 43,6]	20,4 [14,2 ÷ 27,8]	0,03
CD1a+ Д (абс. к-во / 0,15 мм <sup>2</sup> )	42 [21,2 ÷ 43,8]	19,4 [17,6 ÷ 22,4]	0,009

Примечание:  $p$  — уровень статистической значимости при сравнении показателей до начала лечения и на 6-й неделе терапии;

\* медиана значений, в скобках приведены границы интерквартильных отрезков;

Э — эпидермис;

Д — дерма.

ТАБЛИЦА 2

**Содержание толл-подобных рецепторов и клеток Лангерганса в пораженной коже больных псориазом в процессе лечения инфликсимабом**

Показатель	До лечения ( $n = 6$ )	6-я неделя лечения ( $n = 6$ )	1 год от начала лечения ( $n = 6$ )	$p_1$	$p_2$	$p_3$
TLR2 Э (pix <sup>2</sup> )	1930725 [1499199 ÷ 2104937]	1149696 [748576 ÷ 1954959]	908169 [633099 ÷ 1177401]	0,046	0,028	0,172
TLR2 Д (%)	5,4 [5,0 ÷ 6,2]	2,7 [2,2 ÷ 4,8]	2,5 [2,3 ÷ 2,7]	0,028	0,028	0,116
TLR4 Э (pix <sup>2</sup> )	1847296 [1459871 ÷ 2103773]	1238115 [765185 ÷ 1590514]	763169 [633099 ÷ 1106869]	0,028	0,028	0,172
TLR4 Д (%)	5,9 [4,0 ÷ 9,0]	2,8 [2,2 ÷ 5,9]	2,6 [2,4 ÷ 2,7]	0,046	0,046	0,465
CD1a+ Э (абс. к-во / 0,5 мм)	29,7 [26,4 ÷ 43,6]	24,0 [18,4 ÷ 27,8]	17,9 [13,8 ÷ 19,2]	0,116	0,046	0,249
CD1a+ Д (абс. к-во / 0,15 мм <sup>2</sup> )	31,5 [21,2 ÷ 42,0]	18,5 [14,2 ÷ 20,3]	11,7 [10,4 ÷ 12,6]	0,028	0,028	0,028

Примечание:

$p_1$  — уровень статистической значимости при сравнении показателей до начала лечения и на 6-й неделе лечения;

$p_2$  — уровень статистической значимости при сравнении показателей до начала лечения и через 1 год от начала лечения;

$p_3$  — уровень статистической значимости при сравнении показателей на 6-й неделе лечения и через 1 год от начала лечения.

казателей, полученных на 6-й неделе и через 1 год от начала лечения, различий обнаружено не было (см. таблицу 2).

Анализ исследуемых показателей врожденно-го иммунитета у больного с отсутствием эффекта от лечения выявил увеличение площади экспрессии толл-подобных рецепторов TLR2 и TLR4, а также содержания клеток Лангерганса в эпидермисе и в дерме по сравнению с таковыми до начала лечения.

Реакция с поликлональными антителами к TLR9 до начала лечения, на 6-й неделе и через 1 год от начала терапии препаратом инфликсимаб в эпидермисе и дерме у больных псориазом была отрицательной.

На 6-й неделе лечения препаратом инфликсимаб разрешение высыпаний сопровождалось статистически значимым уменьшением количества

субпопуляций Т-лимфоцитов. Количество CD4+ хелперных лимфоцитов статистически достоверно снижалось до 0,4 [0 ÷ 0,6]/0,5 мм в эпидермисе и до 19,2 [13,8 ÷ 24,8]/0,15 мм<sup>2</sup> в дерме. Количество CD8+ цитотоксических лимфоцитов на 6-й неделе лечения инфликсимабом статистически достоверно снижалось до 6,6 [4,0 ÷ 13,8]/0,5 мм в эпидермисе и до 18,4 [7,8 ÷ 39,6]/0,15 мм<sup>2</sup> в дерме. Количество CD45RO+ Т-клеток памяти на 6-й неделе лечения препаратом инфликсимаб статистически достоверно снижалось до 1,6 [1,0 ÷ 4,0]/0,5 мм в эпидермисе и до 40,6 [28,4 ÷ 67,8]/0,15 мм<sup>2</sup> в дерме (табл. 3). При анализе биоптатов кожи, полученных через 1 год от начала терапии, абсолютное содержание всех исследуемых субпопуляций Т-лимфоцитов было ниже, чем до начала лечения (табл. 4.) При сравнении исследуемых

ТАБЛИЦА 3

**Содержание субпопуляций Т-лимфоцитов и молекул межклеточной адгезии в пораженной коже больных псориазом до начала лечения и на 6-й неделе терапии инфликсимабом**

Показатель	До лечения (n = 15)	6-я неделя лечения (n = 15)	p
CD4+ Э3 (абс. к-во / 0,5 мм)	1,6 [1,2 ÷ 2,0]*	0,4 [0 ÷ 0,6]	0,007
CD4+ Д4 (абс. к-во / 0,15 мм <sup>2</sup> )	50,2 [34,2 ÷ 61,0]	19,2 [13,8 ÷ 24,8]	0,004
CD8+ Э (абс. к-во / 0,5 мм)	23,0 [11,6 ÷ 31,4]	6,6 [4,0 ÷ 13,8]	0,006
CD8+ Д (абс. к-во / 0,15 мм <sup>2</sup> )	41,4 [33,6 ÷ 53,4]	18,4 [7,8 ÷ 39,6]	0,02
CD45RO+ Э (абс.к-во / 0,5 мм)	16,4 [11,2 ÷ 23,2]	1,6 [1,0 ÷ 4,0]	0,0008
CD45RO+ Д (абс. к-во / 0,15 мм <sup>2</sup> )	104,4 [56,6 ÷ 139,2]	40,6 [28,4 ÷ 67,8]	0,0008

Примечание: p — уровень статистической значимости при сравнении показателей до начала лечения и на 6-й неделе терапии;

\* медиана значений, в скобках приведены границы интерквартильных отрезков;

Э — эпидермис;

Д — дерма.

ТАБЛИЦА 4

**Содержание субпопуляций Т-лимфоцитов и молекул межклеточной адгезии в пораженной коже больных псориазом в процессе лечения инфликсимабом**

Показатель	До лечения (n = 6)	6-я неделя лечения (n = 6)	1 год от начала лечения (n = 6)	p <sub>1</sub>	p <sub>2</sub>	p <sub>3</sub>
CD4+ Э (абс. к-во / 0,5 мм)	1,3 [0,8 ÷ 1,6]	0,3 [0,2 ÷ 0,4]	0,1 [0 ÷ 0,4]	0,028	0,028	0,345
CD4+ Д (абс. к-во / 0,15 мм <sup>2</sup> )	47,4 [43,6 ÷ 59,4]	17,2 [14,0 ÷ 21,6]	28,5 [23,8 ÷ 31,4]	0,046	0,028	0,345
CD8+ Э (абс. к-во / 0,5 мм)	27,2 [20,8 ÷ 31,4]	7,6 [6,6 ÷ 14,8]	1,6 [0,8 ÷ 10,6]	0,028	0,028	0,116
CD8+ Д (абс. к-во / 0,15 мм <sup>2</sup> )	42,9 [39,4 ÷ 50,8]	21,1 [15,4 ÷ 25,4]	29,8 [25,8 ÷ 44,2]	0,028	0,116	0,173
CD45RO+ Э (абс.к-во / 0,5 мм)	19,9 [16,4 ÷ 25,6]	1,8 [1,2 ÷ 4,0]	1,9 [0,6 ÷ 8,2]	0,028	0,028	0,892
CD45RO+ Д (абс. к-во / 0,15 мм <sup>2</sup> )	124,1 [98,2 ÷ 162,0]	53,6 [38,0 ÷ 71,6]	40,2 [36,7 ÷ 48,9]	0,028	0,028	0,173

Примечание: p<sub>1</sub> — уровень статистической значимости при сравнении показателей до начала лечения и на 6-й неделе лечения;

p<sub>2</sub> — уровень статистической значимости при сравнении показателей до начала лечения и через 1 год от начала лечения;

p<sub>3</sub> — уровень статистической значимости при сравнении показателей на 6-й неделе лечения и через 1 год от начала лечения.

показателей в биоптатах, полученных на 6-й неделе лечения и через 1 год от начала лечения, было установлено повышение количества CD4+ лимфоцитов и CD8+ лимфоцитов в дерме, которое тем не менее было ниже по сравнению с показателями до начала лечения. По остальным параметрам статистически значимых различий обнаружено не было (см. таблицу 4).

Анализ показателей адаптивного иммунитета у больного с отсутствием эффекта от лечения выявил увеличение содержания всех субпопуляций Т-лимфоцитов по сравнению с таковыми до начала лечения.

Разрешение высыпаний на 6-й неделе лечения инфликсимабом сопровождалось статистически значимым уменьшением площади экспрессии молекул межклеточной адгезии в эпидермисе и дер-

ме (табл. 5). Площадь экспрессии молекулы межклеточной адгезии ICAM-1 в эпидермисе снижалась до 978311 pix<sup>2</sup> [790936 ÷ 1448024], в дерме до 4,0% [2,8 ÷ 7,0]. Площадь экспрессии Е-селектина в дерме уменьшалась до 3,8 % [3,4 ÷ 6,4] (см. таблицу 5). При анализе биоптатов кожи, полученных через 1 год от начала терапии, абсолютное содержание молекул адгезии было ниже, чем до начала лечения (табл. 6). При сравнении уровней экспрессии молекул межклеточной адгезии ICAM-1 и Е-селектина в биоптатах, полученных на 6-й неделе лечения и через 1 год от начала лечения, статистически значимых различий обнаружено не было (см. таблицу 6).

При анализе содержания молекул адгезии у больного с отсутствием эффекта от лечения отмечалось увеличение площади экспрессии молекул ICAM-1

**ТАБЛИЦА 5**
**Содержание провоспалительного цитокина ИЛ-1 в пораженной коже больных псориазом до начала лечения и на 6-й неделе терапии инфликсимабом**

Показатель	До лечения (n = 15)	6-я неделя лечения (n = 15)	p
ICAM-1 ЭЗ (pix <sup>2</sup> )	2062758 [1840554 ÷ 2195272]*	978311 [790936 ÷ 1448024]	0,002
ICAM-1 Д4 (%)	7,8 [6,1 ÷ 9,1]	4,0 [2,8 ÷ 7,0]	0,003
Е-селектин Д (%)	8,5 [5,7 ÷ 10,0]	3,8 [3,4 ÷ 6,4]	0,006
ИЛ-1 Э (pix <sup>2</sup> )	1997168 [1568593 ÷ 2252900]	970420 [776210 ÷ 1466426]	0,004
ИЛ-1 Д (%)	7,9 [5,9 ÷ 9,8]	4,0 [2,9 ÷ 6,5]	0,002

Примечание: p — уровень статистической значимости при сравнении показателей до начала лечения и на 6-й неделе терапии;

\* медиана значений, в скобках приведены границы интерквартильных отрезков;

Э — эпидермис;

Д — дерма.

**ТАБЛИЦА 6**
**Содержание провоспалительного цитокина ИЛ-1 в пораженной коже больных псориазом в процессе лечения инфликсимабом**

Показатель	До лечения (n = 6)	6-я неделя лечения (n = 6)	1 год от начала лечения (n = 6)	p <sub>1</sub>	p <sub>2</sub>	p <sub>3</sub>
ICAM-1 Э (pix <sup>2</sup> )	1927174 [1840554 ÷ 2198034]	1213168 [844828 ÷ 1697997]	747692 [640391 ÷ 11168696]	0,028	0,028	0,043
ICAM-1 Д (%)	6,9 [4,7 ÷ 8,3]	3,9 [2,8 ÷ 4,8]	2,7 [2,3 ÷ 2,8]	0,028	0,028	0,043
Е-селектин Д (%)	7,6 [5,1 ÷ 8,8]	3,9 [3,4 ÷ 4,5]	2,6 [2,4 ÷ 2,8]	0,028	0,028	0,464
ИЛ-1 Э (pix <sup>2</sup> )	1985176 [1568593 ÷ 2209960]	1218423 [841457 ÷ 1651849]	728000 [659120 ÷ 1170327]	0,046	0,028	0,173
ИЛ-1 Д (%)	7,1 [5,0 ÷ 8,5]	4,0 [2,9 ÷ 4,7]	2,5 [2,3 ÷ 2,8]	0,028	0,028	0,028

Примечание:

p<sub>1</sub> — уровень статистической значимости при сравнении показателей до начала лечения и на 6-й неделе лечения;

p<sub>2</sub> — уровень статистической значимости при сравнении показателей до начала лечения и через 1 год от начала лечения;

p<sub>3</sub> — уровень статистической значимости при сравнении показателей на 6-й неделе лечения и через 1 год от начала лечения.

в эпидермисе и дерме и Е-селектина в дерме по сравнению с таковыми до начала лечения.

Разрешение высыпаний на 6-й неделе лечения инфликсимабом сопровождалось статистически значимым уменьшением площади экспрессии провоспалительного цитокина ИЛ-1 в эпидермисе и дерме (см. таблицу 5). Площадь экспрессии провоспалительного цитокина ИЛ-1 в эпидермисе снижалась до 970420 pix<sup>2</sup> [776210 ÷ 1466426], в дерме до 4,0% [2,9 ÷ 6,5]. При анализе биоптатов кожи, полученных через 1 год от начала терапии, абсолютное содержание провоспалительного цитокина ИЛ-1 было ниже, чем до начала лечения (см. таблицу 6). При сравнении уровней экспрессии провоспалительного цитокина ИЛ-1 в биоптатах, полученных на 6-й неделе лечения и через 1 год от начала лечения, статистически значимых различий обнаружено не было (см. таблицу 6).

При анализе уровня содержания молекул адгезии у больного с отсутствием эффекта от лечения отме-

чалось увеличение площади экспрессии провоспалительного цитокина ИЛ-1 в эпидермисе и дерме по сравнению с таковыми до начала лечения.

Реакция с моноклональными антителами к ФНО-α до начала лечения, на 6-й неделе и через 1 год от начала терапии препаратом инфликсимаб была расценена как отрицательная.

### Обсуждение результатов

В настоящей работе нами не только была изучена клиническая эффективность инфликсимаба, но и проведено углубленное исследование механизма его действия на тканевом уровне по показателям динамики содержания параметров иммунного каскада в коже, лежащих в основе патогенеза псориаза.

В результате проведенных исследований установлена высокая клиническая эффективность препарата. К 6-й неделе лечения у 12 (32%) больных величина индекса PASI уменьшалась на 90% и более, у 19



(50%) больных — на 75—89%, у 5 (13%) больных на 50—74%. У 1 больного положительный эффект от лечения инфликсимабом отсутствовал. В целом в группе наблюдалось статистически значимое снижение индекса PASI с 35,6 [27,6 ÷ 47,6] до 5,3 [3,0 ÷ 9,5] балла. Лечение переносилось пациентами хорошо. Однако необходимо отметить, что при высокой эффективности и хорошей переносимости препарата у части больных отмечалось появление немногочисленных папулезных элементов с незначительной инфильтрацией и шелушением. Высыпания полностью разрешались после очередной инфузии инфликсимаба.

Установлено, что разрешение высыпаний у больных псориазом в процессе терапии препаратом инфликсимаб сопровождалось уменьшением в коже экспрессии толл-подобных рецепторов 2 и 4 (TLR2 и TLR4) и достоверным снижением количества антигенпрезентирующих клеток Лангерганса в дерме. Через 1 год от начала терапии содержание исследуемых показателей оставалось ниже, чем до начала лечения. При отсутствии эффекта от проводимой терапии в пораженной коже не только сохранялся высокий уровень экспрессии толл-подобных рецепторов и клеток Лангерганса, но и наблюдалось увеличение их количества при прогрессировании симптомов.

В доступной литературе мы не нашли сведений, посвященных изучению уровня содержания толл-подобных рецепторов и клеток Лангерганса в пораженной коже больных псориазом на фоне лечения инфликсимабом. Известно, однако, что внутриклеточные части толл-подобных рецепторов обладают высокой степенью гомологии с внутриклеточными доменами рецепторов провоспалительных цитокинов ИЛ-1 и ФНО- $\alpha$  [11]. Следовательно, ФНО- $\alpha$ , синтезируемый после активации толл-подобных рецепторов структурами врожденного иммунитета в коже, может использовать тот же молекулярный путь, усиливая активационный сигнал для привлечения клеток, тем самым развивая адаптивный иммунитет. Подтверждением возникновения подобной ситуации у пациентов, больных псориазом, в процессе лечения инфликсимабом служат полученные нами результаты, свидетельствующие о том, что к 6-й неделе лечения инфликсимабом наблюдается статистически значимое уменьшение площади экспрессии толл-подобных рецепторов TLR2 и TLR4 в очагах пораженной кожи у больных псориазом.

Количество клеток с фенотипом CD1a+ достоверно уменьшается в дерме, однако в эпидермисе наблюдается лишь тенденция к снижению содержания CD1a+ клеток Лангерганса, которая сохраняется на протяжении 1 года. Это означает, что в эпидермисе больных псориазом даже на фоне терапии инфликсимабом сохраняются условия, способствующие миграции клеток Лангерганса.

На основании полученных результатов к особенностям механизма противовоспалительного эффекта

инфликсимаба у пациентов, больных псориазом, вполне можно отнести опосредованное его воздействие через влияние на структуры врожденного иммунитета, что подтверждается тем, что через 1 год от начала терапии уровень содержания исследуемых показателей остается ниже, чем до начала лечения. Очевидно, что противовоспалительный эффект инфликсимаба с участием структур врожденного иммунитета наблюдается не у всех пациентов, поскольку при отсутствии эффекта от лечения наблюдается усиление экспрессии изучаемых показателей.

На 6-й неделе лечения инфликсимабом разрешение высыпаний сопровождалось уменьшением количества CD4+ лимфоцитов, CD8+ лимфоцитов и CD45RO+ лимфоцитов в пораженной коже больных псориазом, что свидетельствует о снижении миграции этих клеток в очаг воспаления под влиянием лечения. Через 1 год от начала терапии, при появлении у больных высыпаний незадолго до очередной инфузии инфликсимаба, в дерме наблюдалось увеличение количества CD4+ лимфоцитов и CD8+ лимфоцитов. Несмотря на это, уровень содержания CD4+ лимфоцитов, CD8+ лимфоцитов и CD45RO+ лимфоцитов в пораженной коже оставался ниже, чем до начала лечения инфликсимабом. При отсутствии эффекта от лечения в очагах пораженной кожи наблюдалось увеличение уровня содержания исследуемых субпопуляций Т-лимфоцитов, что является доказательством постоянного притока их в очаг воспаления.

Разрешение высыпаний у больных псориазом в процессе терапии препаратом инфликсимаб сопровождалось уменьшением площади экспрессии молекулы межклеточной адгезии ICAM-1 в эпидермисе и дерме и Е-селектина в дерме, а также провоспалительного цитокина ИЛ-1 в эпидермисе и дерме. Через 1 год от начала терапии уровень содержания исследуемых показателей остается ниже, чем до начала лечения. При отсутствии эффекта от проводимой терапии в пораженной коже не только сохраняется высокий уровень экспрессии молекул межклеточной адгезии ICAM-1 и Е-селектина и провоспалительного цитокина ИЛ-1, но и наблюдается увеличение их количества при прогрессировании симптомов.

Исследования, посвященные изучению уровня содержания субпопуляций лимфоцитов и молекул межклеточной адгезии в коже больных псориазом на фоне лечения инфликсимабом, немногочисленны. В работе V. Vincsek и соавт. (2004) [12] было показано выраженное уменьшение количества CD3+, CD45RO+ лимфоцитов, а также нейтрофильных лейкоцитов в пораженной коже больных в течение уже 72 часов от момента первой инфузии инфликсимаба. A.Y. Goedkoop и соавт. (2004) [13] установили снижение в эпидермисе и дерме пораженной кожи больных псориазом уровня содержания CD3+ лимфоцитов и молекул межклеточной адгезии ICAM-1 и Е-селектина на 4-й

неделе лечения инфликсимабом в дозе 3 мг/кг массы тела. Лечение, однако, проводилось в сочетании с метотрексатом (5—20 мг/нед.), который также может оказывать влияние на выработку молекул межклеточной адгезии.

ФНО- $\alpha$  является одним из основных провоспалительных цитокинов, поддерживающих локальный воспалительный процесс в очагах поражения при псориазе. Известно, что одной из функций ФНО- $\alpha$  является индукция синтеза молекул межклеточной адгезии, при участии которых у больных псориазом происходит миграция Т-лимфоцитов в очаг воспаления. Связывание ФНО- $\alpha$  приводит к блокаде его биологических эффектов, в том числе к уменьшению экспрессии молекул межклеточной адгезии и, как следствие, к замедлению миграции лимфоцитов в очаг поражения. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что к 6-й неделе лечения инфликсимабом наблюдается статистически значимое уменьшение площади экспрессии молекул межклеточной адгезии ICAM-1 и Е-селектина в очагах пораженной кожи у больных псориазом. Это сопровождается выраженным сниже-

нием миграции CD4+, CD8+ и CD45RO+ лимфоцитов в очаг воспаления.

### Заключение

Таким образом, инфликсимаб, связывая провоспалительный цитокин ФНО- $\alpha$ , прерывает биологические эффекты всего каскада, обеспечивающего развитие иммунного воспаления в коже. Терапия инфликсимабом на 6-й неделе приводит к статистически значимому снижению в очагах пораженной кожи больных псориазом экспрессии распознающих рецепторов (TLR2 и TLR4), уменьшению количества Т-лимфоцитов (CD4+, CD8+, CD45RO+), снижению экспрессии молекул межклеточной адгезии (ICAM-1 и Е-селектина) и провоспалительного цитокина ИЛ-1. Количество клеток Лангерганса в эпидермисе остается высоким, что свидетельствует о том, что связывание ФНО- $\alpha$  не влияет на наличие хемоаттрактантов, обеспечивающих миграцию клеток Лангерганса в эпидермис. Полученные результаты позволяют расширить понимание механизма клинической эффективности инфликсимаба. ■

### Литература

1. Griffiths C.E., Barker J.N. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 2007; 370: 263—271.
2. Gudjonsson J.E. Psoriasis: epidemiology. *Clin. Dermatol* 2007; 25:6: 535—546.
3. Lowes M.A. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 2007; 445: 22: 866—872.
4. Gudjonsson J.E., Elder J.T. "Psoriasis." In: Wolff K, Goldsmith L.A., Katz S.I. et al. (editors) *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 7th ed. New York: McGraw Hill Medical; 2008. p. 169—93.
5. Клиническая дерматовенерология / Под ред. Ю.К. Скрипкина, Ю.С. Бутова. М.: ГЭОТАР-Медиа 2009; II: 8: 212—33.
6. Navarini A.A. Psoriasis. *Therapeutische Umschau* 2010; 67: 4: 153—165.
7. Braun J. Overview of the use of the anti-TNF agent infliximab in chronic inflammatory diseases. *Expert. Opin Biol Ther* 2003; 3: 1: 141—168.
8. Gottlieb A.B. Infliximab induction therapy for patients with severe plaque-type psoriasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51: 4: 534—542.
9. Кубанов А.А. Опыт применения препарата инфликсимаб в лечении больных псориазом тяжелого течения. *Вестн. дерматол. и венерол.*, 2008; 6: 81—86.
10. Курдина М.И. Клинико-иммунологические параллели у больных псориазом на фоне лечения инфликсимабом. *Клин. дерматол. и венерол.*, 2010; 2: 77—80.
11. Симбирцев А.С. Толл-белки: специфические рецепторы неспецифического иммунитета. *Иммунология*, 2005; 6: 368—377.
12. Vincek V. Infliximab monotherapy in psoriasis: A case of rapid clinical and histological response. *Intern J of Dermatol* 2004; 43: 303—308.
13. Goedkoop A.Y. Deactivation of endothelium and reduction in angiogenesis in psoriatic skin and synovium by low dose infliximab therapy in combination with stable methotrexate therapy: a prospective single-centre study. *Arthritis Res Ther* 2004; 6: 326—334.